PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/17937
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Mai 1997 (22.05.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02181

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. November 1996 (14.11.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 42 838.2 17. November 1995 (17.11.95) DE
196 40 630.7 1. Oktober 1996 (01.10.96) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: FRANZ, Wolfgang-M. [DE/DE]; Fasanenring 15b, D-23627 Gross Grönau (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: ROTHMANN, Thomas [DE/DE]; Im Karolingerweg 11, D-69123 Heidelberg (DE). KATUS, H.A. [DE/DE]; Domhof 23, D-23909 Ratzeburg (DE).

(74) Anwalt: BARDEHLE, PAGENBERG, DOST, ALTENBURG, FROHWITTER, GEISLER & PARTNER; Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: GENE-THERAPEUTIC NUCLEIC ACID CONSTRUCT, PRODUCTION OF SAME AND USE OF SAME IN THE TREATMENT OF HEART DISORDERS

(54) Bezeichnung: GENTHERAPEUTISCHES NUKLEINSÄUREKONSTRUKT, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG VON HERZERKRANKUNGEN

(57) Abstract

The invention relates to a gene-therapeutic nucleic acid construct containing a regulatory nucleic acid sequence of the 5'-end of the myosin light chain 2 (MLC-2) heart gene. The regulatory nucleic acid sequence in question is functionally connected to a nucleic acid which codes for a therapeutically active gene product, antisense nucleic acid or ribozyme. Also disclosed is a process for producing the construct and its use in gene therapy for treating heart disorders.

(57) Zusammenfassung

Bei der Erfindung handelt es sich um ein gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert, sowie um ein Verfahren zu dessen Herstellung und die Verwendung zur gentherapeutischen Behandlung von Herzerkrankungen.

AM

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt, seine Herstellung und Verwendung zur Behandlung von Herzerkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung und die Verwendung zur gentherapeutischen Behandlung von Herzerkrankungen.

Das Krankheitsbild der Kardiomyopathie umfaßt eine Gruppe von Herzmuskelerkrankungen, welche sich sowohl in kontraktilen als auch in elektrophysiologischen Störungen zeigen und letztlich zur schweren Herzinsuffizienz und/oder zum plötzlichen, elektrophysiologischen Herztod führen. Die Suche nach monogenetischen Ursachen bei familiären Formen der dilatativen und hypertrophen Kardiomyopathie ist derzeit Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. So konnten gerade in jüngster Zeit genetische Ursachen für Herzmuskelerkrankungen auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Beispielsweise verursacht die sogenannte Duchenne Muskeldystrophie (DMD) auch eine Kardiomyopathie. DMD ist eine Erbkrankheit, die durch Mutationen und Deletionen im Dystrophingen verursacht wird. Das Dystrophingen ist auf dem

X-Chromosom lokalisiert und wird beim gesunden Menschen u. a. in Herzmuskelzellen exprimiert. Ferner wurde gefunden, daß bei dem chronisch congestiven Herzfehler (CHF) das Myokard 50% weniger an ß-adrenergischem Rezeptor enthält als gesundes Myokard.

Nach der Identifizierung genetischer Defekte oder dem Nachweis einer veränderten Genexpression in erkrankten Herzmuskelgeweben ergibt sich daher die Möglichkeit, die Krankheiten mittels molekularbiologischer Methoden zu heilen. So stellt beispielsweise der somatische Gentransfer eine vielversprechende Methode dar, genetisch bedingte Herzmuskelerkrankungen zu behandeln.

Für den somatischen Gentransfer eignen sich verschiedene Methoden, wie z. B. der Gentransfer durch Injektion von DNA, der Liposomen-unterstützte Gentransfer oder der Gentransfer mittels retroviraler, adenoviraler oder adeno-assoziierter Vektoren. Wesentliche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Gentherapie sind eine hohe Übertragungsrate, eine stabile Genexpression und vor allem die Gewebespezifität.

In der WO94/11506 wird der erfolgreiche Gentransfer und die erfolgreiche Expression eines Gens kodierend für die ß-Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors sowohl in glatten Muskelzellen der Koronargefäße als auch in Herzmuskelzellen gezeigt. Eine Herzmuskel-spezifische Expression konnte jedoch nicht erreicht werden. In der Beschreibung wird zwar allgemein auf den Herzmuskel-spezifischen Troponin C (cTNC) Promotor hingewiesen, ohne jedoch eine herzspezifische in vivo Expression zu zeigen.

Aus Franz, W.-M. et al. (1994) Cardioscience, 5, 235-243, No. 4 ist bekannt, daß die Mikroinjektion einer nackten DNA eines Myosin-Leichte-Ketten-2(MLC-2)-Promotor-Luciferase-Fusionsgens in den männlichen Pronukleus von fertilisierten Mausoozyten eine transgene Maus erzeugt, die eine Herzmuskel-spezifische Expression des Luciferasegens besitzt.

Myosin, eine Hauptkomponente des Herzmuskels und anderer gestreifter Muskeln, besteht aus zwei schweren Ketten (MHC) und zwei Paaren von Myosin-Leichte-Ketten (MLC). Die MLC teilen sich wiederum in eine nicht-phosphorylierbare (MLC-1) und eine phosphorylierbare (MLC-2) Form. Es wurde nun gefunden, daß die regulatorische Nukleinsäuresequenz (Promotor) am 5'-Ende der MLC-2 Gene der Skelettmuskel und der Herzmuskel der Ratte unterschiedlich sind, jedoch der MLC-2 Gene der Herzmuskel der Ratte und des Huhns konserviert sind, obwohl die Ratte und das Huhn evolutionär weit getrennt sind (Henderson, S. A. et al. (1989) J. Biol. Chem., 264, 18142-18148). Lee et al. (Lee, K. J. et al. (1994) Mol. Cell. Biol., 14, 1220-1229, No. 2) fanden nun anhand von transgenen Mäusen, daß eine Kombination von positiven (HF-1a und HF-1b) und negativen (E-Box und HF-3) regulatorischen Elementen, die innerhalb von 250 Basenpaaren stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegen, eine Ventrikelkammer-spezifische Expression verursacht, obwohl ein Erhalt der Spezifität bei einer gentherapeutischen in vivo Applikation bis heute nicht gezeigt werden konnte. Franz, W.-M. et al. (1994), supra fanden jedoch ebenso anhand von transgenen Mäusen, daß für die Herzmuskel-spezifische Expression eine weitere regulatorische Sequenz, die sogenannte herzspezifische Sequenz (CSS), ein ca. 1700 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegendes Repressorelement, notwendig ist. Aus diesen Ergebnissen erkennt man, daß der Mechanismus zur Herz-spezifischen Expression von Genen noch nicht geklärt ist und eine Herz-spezifische Expression eines Gens nach in vivo Applikation des Gens noch nicht gefunden wurde.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Nukleinsäurekonstrukt zu finden, das für die Gentherapie von Herzerkrankungen ine hohe Übertragungsrate, eine stabile Genexpression und vor allem eine Spezifität für Herzmuskelzellen besitzt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, vorzugsweise des Herzens eines Säugetiers, insbesondere vom Menschen oder von einem Nager, vor allem von der Ratte, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert.

Als regulatorische Nukleinsäuresequenz im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man im allgemeinen die stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (+1) des MLC-2 Gens gelegene Nukleinsäuresequenz, die die Transkription einer mit dieser Sequenz am 3'-Ende verbundenen, stromabwärts liegenden Nukleinsäuresequenz insbesondere bezüglich des korrekten Transkriptionsstartes, der Transkriptionsrate und/oder der Herzmuskel-Gewebespezifität kontrolliert, d.h. die regulatorische Nukleinsäuresequenz ist mit der stromabwärts liegenden Nukleinsäuresequenz funktionell verbunden. Die Sequenz von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -800 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des MLC-2 Gens des Herzens ist besonders bevorzugt (siehe Abb. 10), da es besonders überraschend war, daß ungefähr 800 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt ausreichend sind, um bei einer in vivo Applikation eine Herz-spezifische und insbesondere eine Herzkammer-spezifische Expression zu bewirken, obwohl diese Sequenz die sogenannte herzspezifische Sequenz CSS nicht enthält. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist auch eine Sequenz von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1600 und insbesondere von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1800, vor allem von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2100 oder von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2700 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des MLC-2 Gens des Herzens (siehe Abb. 10). Die regulatorische Nukleinsäuresequenz enthält vor allem ein oder mehrere regulatorische Elemente ausgewählt aus TATA-Box, HF-1a, HF-1b, HF-2, HF-3, E-Box, MLE1 und/oder CSS-Sequenz,

insbesondere ausgewählt aus TATA-Box, HF-1a, HF-1b, HF-2, HF-3, E-Box und/oder MLE1. Beispielsweise liegt bei einer regulatorischen Nukleinsäuresequenz der Ratte die TATA-Box ungefähr zwischen -198 und -19, das HF-1 Element, eine konservierte 28 Basen lange Sequenz, ungefähr zwischen -72 und -45 und insbesondere das HF-1a Element ungefähr zwischen -57 und -65 und das HF-1b Element ungefähr zwischen -45 und -56, das HF-2 Element ungefähr zwischen -123 und -134, das HF-3 Element ungefähr zwischen -186 und -198, das E-Box Element ungefähr zwischen -72 und -77, das MLE1 Element ungefähr zwischen -165 und -176 und das CSS-ähnliche Element ungefähr zwischen -1723 und -1686 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des MLC-2 Gens (siehe Abb. 10). Bei dem MLC-2 Gen der Ratte liegen die regulatorischen Sequenzen TATA-Box, HF-1b Element, HF-1a Element, E-Box Element, HF-2 Element, MLE1 Element und HF-3 Element in dieser Reihenfolge innerhalb der ersten 200 Basen stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des Gens (siehe Abb. 10).

Für die herzspezifische Expression ist es bevorzugt, wenn das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt das HF-1a Element, das HF-1b Element, das MLE1 Element und das HF-3 Element, vorzugsweise zusammen mit dem E-Box Element, insbesondere zusammen mit dem E-Box Element und/oder HF-2 Element, enthält. In jedem Fall ist es ebenso bevorzugt, wenn das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich die herzspezifische Sequenz CSS enthält.

Unter einem gentherapeutischen Nukleinsäurekonstrukt im Sinne dieser Erfindung versteht man ein Nukleinsäurekonstrukt mit einer Nukleinsäuresequenz, die insbesondere eine DNA- oder RNA-Sequenz, vorzugsweise eine einzelstängige oder doppelsträngige, vor allem eine doppelsträngige DNA-Sequenz ist, wobei das Nukleinsäurekonstrukt als Arzneimittel für die gentherapeutisch Behandlung von Herzerkrankungen, insbesondere zur Behandlung von Herzinsuffizienz, dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathi , Dystrophinopathie, Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose

oder Restenose der Blutgefäße in vorteilhafterweise verwendet werden kann.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt wird vorzugsweise mit einem Virusvektor und/oder mit Liposomen kombiniert, vorzugsweise mit einem Adenovirusvektor, vor allem mit einem replikationsdefizienten Adenovirusvektor, oder mit einem Adeno-assoziierten Virusvektor, vor allem mit einem Adeno-assoziierten Virusvektor, der ausschließlich aus zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht, ligiert. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die gentechnische Verbindung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes mit einem Adenovirusvektor, vor allem mit einem replikationsdefizienten Adenovirusvektor.

Ein Adenovirusvektor und insbesondere ein replikationsdefizienter Adenovirusvektor sind aus den folgenden Gründen besonders bevorzugt:
Das humane Adenovirus gehört zu der Klasse der doppelsträngigen DNA-Viren mit einem Genom von ca. 36 Kilobasenpaaren (Kb). Die virale DNA kodiert für etwa 2700 verschiedene Genprodukte, wobei man frühe ("early genes") und späte ("late genes") Genprodukte in bezug auf den adenoviralen Replikationszyklus unterscheidet. Die "early genes" werden in vier transkriptionelle Einheiten, E1 bis E4, unterteilt. Die späten Genprodukte kodieren für die Kapsidproteine. Immunologisch können mindestens 42 verschiedene Adenoviren und die Untergruppen A-F unterschieden werden, die alle für die vorliegende Erfindung geeignet sind. Die Transkription der viralen Gene setzt die Expression der E1 Region voraus, welche für einen Transaktivator der adenoviralen Genexpression kodiert. Diese Abhängigkeit der Expression aller nachfolgenden viralen Gene von dem E1-Transaktivator kann für die Konstruktion der nicht replikationsfähigen adenoviralen Vektoren genutzt werden (siehe z. B. McGrory, W. J. et al. (1988) Virol. 163, 614-617 und Gluzman, Y. et al. (1982) in "Eukaryotic Viral

Vectors (Gluzman, Y. ed) 187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). In adenoviralen Vektoren, insbesondere vom Typ 5 (Sequenz siehe Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280-285) und vor allem von der Untergruppe C, wird im allgemeinen die E1-Genregion durch ein Fremdgen mit eigenem Promotor bzw. durch das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt ersetzt. Durch den Austausch der E1-Genregion, welche für die Expression der nachgeschalteten adenoviralen Gene Voraussetzung ist, entsteht ein nicht replikationsfähiges Adenovirus. Diese Viren können sich dann nur in einer Zellinie vermehren, welche die fehlenden E1 Gene ersetzt.

Replikationsdefiziente Adenoviren werden daher im allgemeinen durch homologe Rekombination in der sogenannten 293 Zellinie (humane embryonale Nierenzellinie), die eine Kopie der E1 Region stabil im Genom integriert hat, gebildet. Hierzu werden unter Kontrolle eines eigenen Promotors (z.B. des mlc-2 Promotors gemäß der vorliegenden Erfindung) eine Nukleinsäuresequenz (z.B. die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt gemäß der vorliegenden Erfindung oder für einen Marker, z. B. ß-Galaktosidase/ß-Gal) in rekombinante adenovirale Plasmide kloniert. Anschließend erfolgt die homologe Rekombination beispielsweise zwischen den Plasmiden pAd.mlc-2/ß-Gal und einem E1-defizienten adenoviralen Genom wie z. B. d1327 oder del324 (Adenovirus 5) in der Helferzellinie 293. Bei erfolgreicher Rekombination werden virale Plaques geerntet. Die so erzeugten replikationsdefizienten Viren werden dann in hohen Titern (beispielsweise 10^9 bis 10^{11} "plaque forming units" oder Plaque bildende Einheiten) zur Infektion der Zellkultur oder für die somatische Gentherapie eingesetzt.

Im allgemeinen ist die genaue Insertionsstelle der Fremd-DNA in das adenovirale Genom nicht kritisch. Es ist z. B. auch möglich die Fremd-DNA an die Stelle des deletierten E3 Gens zu klonieren (Karlsson, S. et al. EMBO J. 1986, 5, 2377-2385). Vorzugsweise wird jedoch die E1 Region oder Teile

davon, z. B. die E1A oder E1B Region (siehe z. B. WO95/00655) durch die Fremd-DNA ersetzt, vor allem wenn auch die E3 Region deletiert ist.

Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf das adenovirale Vektorsystem beschränkt, sondern auch Adeno-assoziierte Virusvektoren eignen sich in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt aus folgenden Gründen in besonderer Weise:

Das AAV Virus gehört zur Familie der Parvoviren. Diese zeichnen sich durch ein ikosaedrisches, unbehülltes Kapsid mit einem Durchmesser von 18-30 nm aus, welches eine lineare, einzelsträngige DNA von ca. 5 kb enthält. Für eine effiziente Vermehrung von AAV ist eine Koinfektion der Wirtszelle mit Helferviren erforderlich. Als Helfer eignen sich beispielsweise Adenoviren (Ad5 oder Ad2), Herpesviren und Vacciniaviren (Muzyczka, N. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158, 97-129). In Abwesenheit eines Helfervirus geht AAV in einen Latenzzustand über, wobei das Virusgenom in der Lage ist, stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren. Die Eigenschaft von AAV in das Wirtsgenom zu integrieren macht es als Transduktionsvektor für Säugertierzellen besonders interessant. Für die Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen invertierten terminalen Wiederholungsequenzen (ITR: inverted terminal repeats; siehe z. B. WO95/23867). Sie tragen die in "cis" notwendigen Signale für Replikation, Verpackung und Integration in das Wirtszellgenom. Zur Verpackung in rekombinante Vektorpartikel wird ein Vektorplasmid, welches die Gene für nicht-strukturelle Proteine (rep-Proteine) und für strukturelle Proteine (cap-Proteine) trägt, in Adenovirus-infizierte Zellen transfiziert. Nach einigen Tagen wird ein zellfreies Lysat hergestellt, welches neben den rekombinanten AAV Partikeln auch Adenoviren enthält. Die Adenoviren können vorteilhafterweise durch Erhitzen auf 56°C oder durch Bandieren im Cäsiumchlorid-Gradienten entfernt werden. Mit dieser Cotransfektionsmethode sind rAAV Titer von 10^5-10^6

IE/ml erzielbar. Die Kontamination durch Wildtyp Viren liegt unterhalb der Nachweisgrenze, wenn das Verpackungsplasmid und das Vektorplasmid keine überlappenden Sequenzen besitzen (Samulski, R. J. (1989) J. Virol. 63, 3822-3828).

Der Transfer von Fremdgenen in somatische Körperzellen kann durch AAV in ruhende, differenzierte Zellen erfolgen, was für die Gentherapie des Herzens besonders vorteilhaft ist. Durch die erwähnte Integrationsfähigkeit kann auch eine lang anhaltende Genexpression in vivo gewährleistet werden, was wiederum besonders vorteilhaft ist. Ein weiterer Vorteil von AAV ist, daß das Virus nicht pathogen für den Menschen und relativ stabil in vivo ist. Die Klonierung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes in den AAV-Vektor oder Teilen davon erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, wie sie z. B. in der WO95/23867, bei Chiorini, J. A. et al. (1995) Human Gene Therapy 6, 1531-1541 oder Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5, 793-801 beschrieben sind.

Eine weitere vorteilhafte Kombination im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Komplexierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte mit Liposomen, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz insbesondere von Herzmuskelzellen erreicht werden kann (Felgner, P. L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417). Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleyloxypropyl-3-trimethyl-ammoniumbromid) und DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zellinien getestet (Behr, J. P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, 6982-6986; Felgner, J. H. et

al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550-2561; Gao, X. & Huang, L. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 280-285; Zhou, X. & Huang, L. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195-203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Ein Beispiel für die Herstellung von DNA-Liposomenkomplexen und deren erfolgreiche Anwendung in der Herz-spezifischen Transfektion ist in der DE 44 11 402 beschrieben.

Als therapeutisches Genprodukt eignen sich beispielsweise Dystrophin, der ß-adrenergische Rezeptor, die Stickstoffmonoxid-Synthase oder jedes andere Genprodukt, das z.B. einen monogenetischen Fehler komplementiert, elektrophysiologische Störungen verhindert bzw. verringert oder andere herzspezifische Krankheiten mildern bzw. heilen kann. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn das Gen, das für das therapeutische Genprodukt kodiert (Transgen), ein oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Transgens, und/oder eine polyA Sequenz vor allem am 3'-Ende des Transgens, beispielsweise die endogene polyA Sequenz des jeweiligen Gens, vorzugsweise eine SV40 Virus polyA Sequenz, enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA in der Herzmuskelzelle erreicht werden kann (Jackson, R. J. (1993) Cell 74, 9-14 und Palmiter, R. D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 478-482).

Die mit der regulatorischen Nukleinsäure des MLC-2 Gens funktionell verbundene Nukleinsäure kann jedoch nicht nur eine Nukleinsäure, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt kodiert, sein, sondern auch eine Nukleinsäure, die für eine "antisense" Nukleinsäure, vorzugsweise ein "antisense" Oligonukleotid, insbesondere ein "antisense" DNA-Oligonukleotid oder für ein Ribozym kodiert. Sowohl durch "antisense" Oligonukleotide als auch durch Ribozyme kann die Expression von Genen im Herzen spezifisch verringert bzw.

verhindert werden, wodurch eine Vielzahl von Herz-spezifischen Erkrankungen, wie z. B. die Arteriosklerose oder die Restenose, aber auch Autoimmun- oder Krebserkrankungen behandelt werden können (siehe z. B. Barr, E. & Leiden, J. M. (1994) Trends Cardiovasc. Med. 4, 57-63, No. 2 und Bertrand, E. et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 293-300).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes, wobei die oben näher beschriebene regulatorische Nukleinsäuresequenz funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden wird, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die genannte regulatorische Nukleinsäure und die Nukleinsäure, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert, entweder gleichzeitig oder hintereinander in einen der oben näher beschriebenen Virusvektoren kloniert.

Das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten gentechnischen Methoden (siehe z. B. Maniatis et al. (1982) Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory New York). Die Protein- bzw. Nukleinsäuresequenzen der therapeutisch wirksamen Genprodukte sind beispielsweise über die EMBL Genbank oder jede andere öffentlich zugängliche Genbank erhältlich. Die Sequenz des MLC-2 Gens des Herzens der Ratte ist aus Henderson, S. A. et al. (1989), supra bekannt und die regulatorische Nukleinsäuresequenz des MLC-2 Gens kann der Abb. 10 entnommen werden. Ausgehend von diesen Sequenzen und der bei Henderson, S. A. et al. (1989), supra beschriebenen Methode zur Isolierung des MLC-2 Gens einschließlich der regulatorischen Sequenzen aus einer genomischen Genbank lassen sich ohne w iteres auch zu dem Rattengen homologe Sequenzen aus anderen Tieren oder dem Menschen finden. Insbesondere ist es möglich weitere regulatorische Sequenzen des MLC-2 Gens des Herzens in genomischen Genbanken anderer

Tiere oder des Menschen ohne unzumutbaren Aufwand zu isolieren, da, wie oben bereits erwähnt, die am 5'-Ende gelegenen regulatorischen Nukleinsäuresequenzen des MLC-2 Gens des Herzens sogar zwischen evolutionär weit entfernter Tierarten, wie z. B. der Ratte und dem Huhn, im wesentlichen konserviert sind (Henderson, S. A. et al. (1989), supra).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, bei dem das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt mit Liposomen, wie z.B. in DE 44 11 402 näher beschrieben, komplexiert wird.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes zur gentherapeutischen Behandlung einer Herzerkrankung bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur gentherapeutischen Behandlung einer Herzerkrankung, wobei es sich bei der Herzerkrankung vorzugsweise um die Herzinsuffizienz, dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie, Dystrophinopathie, Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose und/oder Restenose der Blutgefäße handelt. Insbesondere ist es vorteilhaft, wenn das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt im wesentlichen in der Herzkammer (Ventrikel) wirkt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Arzneimittel enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt und gegebenenfalls einen pharmazeutischen Träger, der beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ungefähr 6,0 bis ungefähr 8,0, vor allem von ungefähr 6,8 bis ungefähr 7,8, insbesondere ungefähr 7,4 und/oder einer Osmolarität von ungefähr 200 bis ungefähr 400 milliosmols pro Liter (mosm/L), vorzugsweise von ungefähr 290 bis ungefähr 310 mosm/L enhält. Daneben kann der pharmazeutische Träger auch noch geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe enthalten.

Die Applikation der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte gegebenenfalls in Kombination mit den oben beschriebenen Virusvektoren oder Liposomen erfolgt im allgemeinen intravenös (i. v.), z. B. mit Hilfe eines Katheters. Vorteilhaft ist beispielsweise die direkte Infusion des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes, vor allem in Form rekombinanter Adenoviren, in die Koronararterien des Patienten ("Percutaneous Coronary Gene Transfer", PCGT). Insbesondere ist die Applikation der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, vor allem in Form rekombinanter Adenoviren mit Hilfe eines Ballonkatheters, wie z. B. bei Feldman et al. (Feldman, L. J. et al. (1994) JACC 235A, 906-34) beschrieben, bevorzugt, da hierdurch die Transfektion nicht nur auf das Herz, sondern auch innerhalb des Herzens auf die Injektionsstelle begrenzt werden kann.

Die unerwarteten Vorteile der vorliegenden Erfindung liegen darin, daß das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt bei der gentherapeutischen Behandlung von Herzerkrankungen eine hohe Übertragungsrate zeigt, in den transfizierten Zellen stabil und exprimierbar ist und vor allem seine Spezifität für Herzmuskelzellen nicht verliert. Dies ist deshalb so überraschend, weil z. B. der smmhc-Promotor seine Spezifität für neonatale und adulte glatte Muskelzellen verliert (siehe Beispiel 6 unten) und ein bevorzugter mlc-2 Promotor des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes, der die herzspezifische Sequenz CSS nicht enthält, seine Spezifität insbesondere in Verbindung mit einem Adenovirusvektor behält. Unter Spezifität im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man daher, daß die mlc-2 Promotor-kontrollierte Expression in Kardiomyozyten, insbesondere im Ventrikel, deutlich höher ist als beispielsweise die mlc-2 Promotor-kontrollierte Expression in Gefäßmuskelzellen, vor allem daß der Unterschied in der Expression ungefähr ein bis ungefähr drei, insbesondere ungefähr drei bis ungefähr sechs, vor allem ungefähr drei bis ungefähr vier Zehnerpotenzen beträgt.

Es war auch überraschend, daß der mlc-2 Promotor die Expression der Luciferase wesentlich stärker auf das Herz beschränkt als der αmhc-Promotor (siehe Beispiel 10 unten). Von besonderem Vorteil ist auch, daß mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt die herzspezifische Expression nach in vivo Applikation auf die Herzkammer (Ventrikel) beschränkt ist (siehe Beispiel 11 unten), da es hierdurch beispielsweise möglich ist, die Kontraktionskraft des Ventrikels zu steigern.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern ohne sie darauf zu beschränken.

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der konstruierten Plasmide pAd-Luc, pAd-rsvLuc, pAd-mlcLuc und pAd-smmhcLuc. BamHI, KpnI und HindIII bezeichnen die Restriktionsenzym-schnittstellen der entsprechenden Enzyme. ITR bedeutet "Inverted Terminal Repeat", Ψ die Verpackungssequenz, mlc-2 der "myosin light chain"-2v-Promotor, Luciferase die Luciferase-kodierende Sequenz, Ad 9.4-18 m.u. die adenovirale Sequenz von 9.4 bis 18 "map units" (1 m. u. = 360 bp) von Adenovirus Typ 5 und ori/ampR den "origin of replication" und das Ampicillin-Resistenzgen.

Abb. 2 zeigt die durch homologe Rekombination erhaltenen rekombinanten Adenoviren, die vom Adenovirus del324 abstammen, wobei das Luciferasegen in die ehemalige E1 Region kloniert wurde. Die Expression des Luciferasegens wird entweder durch den smmhc-Promotor (Ad-smmhcLuc), der für die glatte Gefäßmuskulatur spezifisch ist, den mlc-2v-Promotor (Ad-mlcLuc) für die Herzmuskel-spezifische Expression, durch den RSV Promotor (Ad-rsvLuc) als Positivkontrolle oder durch keinen Promotor (Ad-Luc) als Negativkontrolle kontrolliert. Die Abkürzungen sind analog Abb. 1.

Abb. 3A-C zeigen schematische Darstellungen der Luciferaseaktivitäten von Ad-Luc, Ad-rsvLuc Ad-mlcLuc und Ad-smmhcLuc in verschiedenen Zellinien. Der dünne Strich auf jeder Säule stellt die mittlere Standardabweichung dar.

Abb. 4A-C zeigen schematische Darstellungen der Luciferaseaktivitäten von Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in verschiedenen primären Zellgeweben. Der dünne Strich auf jeder Säule stellt die mittlere Standardabweichung der Experimente dar.

Abb. 5A-C zeigen die schematische Darstellungen der Luciferaseaktivität von Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in verschiedenen Geweben nach Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten. Der dünne Strich auf jeder Säule stellt die mittlere Standardabweichung der Experimente dar.

Abb. 6A und B zeigen den histologischen Nachweis der ß-Galaktosidaseaktivität im Myokard nach intrakavitärer Injektion des rekombinanten Adenovirus AD.RSVßgal. Abb. 6A stellt eine Fotographie eines histologischen Schnittes durch den Apex (Injektionsstelle) dar. Abb. 6B stellt die Fotographie eines histologischen Schnittes durch den linken Ventrikel dar. Der Balken entspricht 100 µm.

Abb. 7A-C zeigen den Nachweis adenoviraler DNA in 12 verschiedenen Geweben nach intrakavitärer Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc.

Abb. 7A zeigt eine Photographie eines 2,4%igen Agarosegels mit dem spezifischen 860 bp PCR Produkt, das durch Amplifikation von abnehmenden Mengen Addel324 DNA erzeugt wurde. Als Probe wurden 100 ng genomische DNA der Ratte gemicht mit Addel324 DNA eingesetzt: Spur 1: 10 pg; Spur 2: 1 pg; Spur 3: 100 fg; Spur 4: 10 fg; Spur 5: 1 fg; Spur 6; 0,1 fg; Spur 7: keine virale DNA. M entspricht einem DNA-Marker (100 bp Leiter).

Abb. 7B zeigt eine Photographie eines 2,4%igen Agarosegels mit dem spezifischen 860 bp PCR-Produkt, amplifiziert aus 100 ng genomischer DNA, welche aus den angegebenen Geweben nach intrakavitärer Injektion von Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc isoliert worden war. Ein PCR Ansatz mit 100 ng genomischer DNA der Ratte gemischt mit 1 pg Addel324 DNA diente als Positivkontrolle, ein Ansatz ohne Addel324 DNA als Negativkontrolle.

Abb. 7C zeigt einen Southern-Blot des Ad-mlcLuc infizierten Tieres gemäß Abb. 7B. Als Sonde wurde das ^{32}P-markierte 860 bp PCR Produkt aus einem Kontrollansatz verwendet.

Abb. 8A und B zeigen die Luciferaseaktivitäten der rekombinanten Adenoviren Ad-αmhcLuc (Abb. 8A) und Ad-mlcLuc (Abb. 8B) nach intrakavitärer Injektion in die linke Hauptkammer neonataler Ratten in verschiedenen Geweben.

Abb. 9A-C zeigen die Luciferaseaktivitäten der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, Ad-αmhcLuc und Ad-Luc im Atrium (Abb. 9A) und im Ventrikel (Abb. 9B). Das Verhältnis der Aktivitäten im Atrium und im Ventrikel zeigt Abb. 9C. Die Säulen zeigen den Median von vier Experimenten, wobei die Punkte die Ergebnisse für die jeweiligen Versuchstiere bzw. das Verhältnis der Luciferaseaktivität im Ventrikel zum Vorhof repräsentieren.

Abb. 10A-C zeigen die Nukleinsäuresequenz eines 2216 Basenpaar-langen stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (+1) gelegenen Promotors des MLC-2v Gens der Ratte. Die Nukleinsäuren von Position 1-156 kodieren für die Verpackungssequenz Ψ des Adenovirus Ad5 (Position 300-456). Die Klonierungssequenz für die Restriktionsendonuklease BamHI befindet sich an Position 158-163 und für KpnI an der Position 189-194. Von Position 189-2405 befindet sich der 2216 Basenpaar-lange Promotor des MLC-2v Gens. Die CSS-ähnliche Sequenz befindet sich an der Position 682-724, das

HF-3 Element an der Position 2207-2219, das MLE1 Element an der Position 2229-2241, das HF-2 Element an der Position 2271-2289, das E-Box Element an der Position 2328-2333, das HF-1a Element an der Position 2340-2348, das HF-1b Element an der Position 2349-2361 und der Transkriptionsstart (+1) an der Position 2406. Die Luciferase-kodierende Sequenz beginnt bei Position 2461. An der Position 1660-2406 liegt die 746 Basenpaar-lange regulatorische Sequenz des Plasmids pAd-mlcLuc (siehe Beispiel 1).

Beispiele

1. Herstellung der rekombinanten Plasmide pAD-Luc, pAd-rsvLuc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhcLuc und pAdαmhcLuc

Dis Plasmide pAD-Luc, pAD-rsvLuc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhcLuc (Abb. 1) und pAdαmhcLuc sind Derivate des Plasmids pAd.RSVßgal (Stradtford-Perricaudet, L. D., J. (1992) Clin. Invest. 90, 626-630), in dem die BamHI-KpnI RSV-ßgal-Kassette ("Rous Sarcoma Virus"-Promotor und ß-Galaktosidase-Reportergen) gegen die Luciferase cDNA mit ihrem endogenen Polyadenylierungssignal entweder ohne Promotor (pAD-Luc), mit dem RSV-Promotor (pAD-RSV-Luc), dem mlc-2v-Promotor (pAD-mlcLuc), dem "smooth muscle myosin heavy chain"-Promotor (pAD-smmhcLuc) oder dem "α-myosin heavy chain"-Promotor (pAD-αmhcLuc) ausgetauscht ist. Hierfür wurde das HindIII/KpnI Fragment des Plasmids pSVOAL, welches für das Luciferasegen kodiert, 5' in die HindIII/KpnI Klonierungsschnittstellen des Vektors pBluescriptSK (Stratagene) subkloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-Luc erzeugt (Wet, J. R. et al. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 725-735). Das BamHI/KpnI Luciferasefragment des Subklons pBluescript-Luc wurde anschließend in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAD.RSV-ßgal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-Luc erzeugt.

Für die Klonierung des Plasmids pAD-rsvLuc wurde das BamHI/HindIII RSV-Fragment (587 bp) des Plasmids pAD.RSV-ßgal in die BamHI/HindIII Schnittstellen des Subklons pBluescript-Luc kloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-RSV-Luc erzeugt. Anschließend wurde das BamHI/KpnI RSV-Luciferase-Fragment des Plasmids pBluescript-RSV-Luc in die BamHI/KpnI Schnittstellen von pAd.RSV-ßgal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-rsvLuc erzeugt.

Zur Herstellung des Plasmids pAD-mlcLuc wurde das BamHI/KpnI mlc-Luciferasefragment (746 Basenpaar-langer "myosin light chain"-2v-Promotor gemäß Abb. 10 und 1.8 kb Luciferasegen) aus dem Plasmid pMLCLΔ5' direkt in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd-RSVßgal kloniert (Henderson, S. A. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 18142-18148). Hierzu wurde das mlc-2/Luciferase Fusionskontrukt an den Restriktionsenzymschnittstellen KpnI herausgeschnitten, die überhängenden Enden in einer sogenannten "Klenow-Reaktion" aufgefüllt und an beiden Enden PvuII-Linker ligiert. Anschließend wurde das 4,0 kb lange mlc-2/Luciferase-DNA Fragment in Analogie zu dem rekombinanten Plasmid pAd.RSVßgal in die PvuII-Schnittstelle am 3'-Ende der 1,3 m.u. Region des Adenovirus Typ 5 (Ad 5) Genoms gekoppelt.

Zur Herstellung des Plasmids pAd-smmhcLuc wurde das 1,2 kb große BamHI/HindIII smmhc-Fragment (Kaninchen "smooth muscle myosin heavy chain" Promotor/-1225/-4) aus dem Plasmid pRBSMHC-1225ßgal (Kallmeier, R.C. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 30949-30957) isoliert und in den BamHI/HindIII geöffneten Subklon pBluescript-Luc vor das Luciferasegen kloniert und dadurch der Subklon p1.2smmhcBluescript-Luc konstruiert. Das BamHI/KpnI smmhc-Luciferase-Fragment dieses Subklons wurde anschließend in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd-RSVßgal kloniert und das Plasmid pAd-smmhcLuc erzeugt.

Die Herstellung des Plasmids pAd-αmhcLuc, das den "α-myosin heavy chain"-Promotor enthält (Subramaniam, A. et al. (1991)

J. Biol. Chem., 266, 24613-24620), wurde ein 1064 bp großes BamHI/HindIII Fragment in die BamHI/HindIII Schnittstellen des Plasmids pBluescript-Luc kloniert. Anschließend wurde daraus ein BamHI/KpnI mhc-Luciferase Fragment in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd.RSV-ßgal kloniert und dadurch das Plasmid pAD-αmhcLuc erhalten.

2. Herstellung der rekombinanten Adenoviren

Die rekombinanten Adenoviren wurden nach Standardmethoden durch homologe Rekombination zwischen den Plasmiden pAd-Luc, pAd-rsvLuc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhcLuc und pAd-αmhcLuc und der genomischen DNA von Adenovirus del324 (Ad5) in 293-Zellen in vivo erzeugt (Thimmappaya, B. et al. (1982) Cell 31, 543-551 und Stradtford-Perricaudet, L. D. et al. (1992), supra und Graham, F. L. et al. (1977) J. Gen. Virol. 36, 59-74). Die rekombinanten Adenoviren besitzen eine Deletion in der E3 Region und die Transgene Luc, RSV-Luc, mlcLuc, pAd-smmhcLuc und pAd-αmhcLuc substituieren die E1 Region. Am Tag vor der Transfektion wurden $2x10^6$ 293-Zellen in eine kleine Zellkulturschale ausplattiert. 5 µg des großen ClaI-Fragments der genomischen DNA von Addel324 wurden zusammen mit 5 µg der AatII linearisierten Plasmide pAd-Luc, pAd-RSV-Luc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhcLuc und pAd-αmhcLuc nach der Kalziumphosphatmethode in 293-Zellen kotransfiziert. Nach Überschichten mit Weichagar (1% SeaPlaque Agarose, 1xMEM, 2% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) und 8-10 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 wurden virale Plaques ausgestanzt und auf 293-Zellen klonal vermehrt. Aus $2x10^6$ vollständig infizierten 293-Zellen wurde die virale DNA der rekombinanten Viren isoliert und durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen auf die korrekte Integration des Transgens untersucht. Von den positiven viralen Klonen wurde erneut eine Einzelplaquereinigung durchgeführt bevor sie in 293-Zellen für eine Großaufarbeitung vermehrt und durch zweimalige Caesium-Chlorid-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt wurden

(Stradtford-Perricaudet, L. D., 1992, supra). Schließlich wurden die Viren gegen TD-Puffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10% (v/v) Glycerin, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) dialysiert und bei -72°C eingefroren. Zur Bestimmung der Titer der rekombinanten Adenoviren wurde der "Plaque Assay" unter Verwendung von 293-Zellen durchgeführt. Alle rekombinanten Adenoviren hatten einen Titer von etwa 10^{11} "plaque forming units" (p.f.u.)/ml. Die DNA der viralen Stammlösungen wurde isoliert und durch eine Analyse mittels Restriktionsendonukleasen und PCR auf die korrekte Integration der Inserts untersucht. Ferner wurden die viralen Stammlösungen mittels PCR auf dem Wildtyp Ad-5 untersucht, wobei in 50 ng der adenoviralen DNA keine Kontamination nachweisbar war (Zang, W. W. et al. (1995) BioTechniques 18, 444-447).

3. Luciferase-Bestimmung

Für die in vitro Studien wurden die Zellen 48 Stunden nach der Infektion geerntet. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität in Proteinextrakten nach etablierten Protokollen mittels Transilluminometer Lumat LB 9501 (Bertold, Wildbad) bestimmt (Ausubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology. Greene and Wiley, New York). Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach Bradford (1976) bestimmt (BioRad, München). Die Luciferaseaktivität wurde in pg Luciferase pro µg Protein umgerechnet (Krougliak, V. & Graham, F. L. (1995) Hum. Gene Ther. 6, 1575-1586 und Franz, W. M. et al. (1993) Circ. Res. 73, 629-638).

Für die in vivo Studien wurden die Ratten 5 Tage nach Injektion dekapitiert. Zwölf verschiedene Gewebe (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Nieren, Quadriceps femoris, Gehirn) wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Gewebeproben gewogen, in

200 µl Lysepuffer (1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 100 mM Kaliumphosphat pH 7,8) aufgenommen, in einem Glashomogenisator aufgeschlossen und für 15 Minuten bei 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Luciferase-Bestimmung eingesetzt (Acsadi, G. et al. (1994) Hum. Mol. Gen. 3, 579-584 und Ausubel, F. M. (1989), supra). Hierzu wurden die Substrate Luciferin und ATP hinzugegeben und die Lichtemission, die proportional zu der Luciferaseaktivität ist, bei 560 nm photometrisch in einem Transilluminometer gemessen. Die Luciferaseaktivität wurde in "relative light units" (RLU)/mg Gewebe-Naßgewicht nach Abzug der Hintergrundsaktivität, die für die verschiedenen Gewebe in nicht-infizierten Tieren ermittelt wurde, angegeben.

4. ß-Galaktosidase-Bestimmung

Die Herzen neonataler Ratten wurden in Stickstoff-gekühltem Isopentan eingefroren und bei -70 °C gelagert. Das Herzgewebe wurde in O. C. T. (Tissue Tek, Miles, USA) Einfriermedium eingebettet und 10 µm Gewebeschnitte mit einem Kryostat (Frigocut 2800 E, Leica) angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten in Lösung A fixiert (PBS, 0,2% (v/v) Glutaraldehyd, 5 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$), 3x10 Minuten mit Lösung B gewaschen (PBS, 0,01% (v/v) Natrium-Desoxycholat, 0,02% (v/v) Nonidet P40, 5 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$) und über Nacht bei 37 °C in Lösung C gefärbt (Lösung B + 1 mg/ml X-Gal, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$). Anschließend wurde einmal mit Lösung B und einmal mit destilliertem Wasser für 10 Minuten gewaschen. Eine schwache Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin sowie das Dehydrieren und Einbetten der Proben erfolgte nach Standardprotokollen (Gossler, A. & Zachgo, J. (1993) "Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras" in Joyner, A. L. (ed.) Gene Targeting, Oxford University Press, 181-225).

5. Nachweis adenoviraler DNA mit Hilfe der PCR-Methode

Parallel zu den Luciferase-Bestimmungen gemäß Beispiel 3 wurde die genomische DNA aus den Sedimenten der Gewebehomogenate der mit Adenoviren infizierten neonatalen Ratten unter Verwendung des QIAamp Tissue Kit (Fa. Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Jeweils zwei der mit Ad-Luc, Ad-RSV-Luc und Ad-mlcLuc infizierten Tiere wurden auf die Gewebeverteilung der injizierten Viren durch die PCR (Polymerasekettenreaktion) zum Nachweis der adenoviralen DNA untersucht (Zhang, W. W. (1995) BioTechniques 18, 444-447). Hierzu wurden 100 ng genomische DNA als Probe zusammen mit 40 ng der Oligonukleotide E2B-1 und E2B-2 und 1,25 U Taq Polymerase von Promega in einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Die Gelelektrophorese des spezifischen PCR Produktes ergab eine 860 bp Bande.

Die Sensitivität der PCR wurde in Vorversuchen bestimmt. Hierzu wurden 100 ng genomische DNA einer nicht infizierten Ratte mit abnehmenden Mengen Addel324 DNA gemischt und in einer PCR-Reaktion als Probe eingesetzt. Um die Sensitivität des Nachweises der PCR zu erhöhen, wurden die PCR Produkte auf eine GeneScreenPlus Nylonmembran (NEN, Boston, Massachusetts) durch Kapillarblot transferiert und anschließend durch Southernblot-Hybridisierung nachgewiesen (Ausubel, F. M. et al. (1989), supra). Als Sonde wurde das durch PCR amplifizierte adenovirale 860 bp DNA-Fragment der Positivkontrolle eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel gereinigt und durch "random hexanucleotide prime" mit ^{32}P radioaktiv markiert und als Probe für die Hybridisierung verwendet. Die Sensitivität des PCR-Nachweises konnte auf diese Weise um den Faktor 10 bis 100 verbessert werden.

6. Infektion von Zellinien (in vitro)

A10- (glatte Muskel-Zellinie der Ratte), H9c2- ((Herzmyoblasten-Zellinie der Ratte) und HeLa- (menschliche

Zervixkarzinom-Zellinie) Zellen wurden in "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM), 293-Zellen in MEM komplementiert, mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Einen Tag vor der Infektion wurden $1x10^5$ Zellen der etablierten Zellinien H9c2, A10 und HeLa in Triplika auf "12 well" Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden in 0,2 ml des jeweiligen serumfreien Mediums, das die rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-RSVLuc, Ad-mlcLuc und Ad-smmhcLuc in einer "multiplicity of infection " (m. o. i.) von 10 enthielt inkubiert (10 Viren/Zelle). Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C mit leichtem Schwänken wurden alle 15 Minuten 2 ml des jeweiligen komplettierten Mediums zugegeben. Alle Infektionsexperimente wurden 4mal wiederholt. Drei Tage nach den Infektionen wurden die Luciferase-Aktivitäten, wie oben beschrieben, gemessen.

Die Ergebnisse der Experimente sind schematisch in der Abb. 3 dargestellt. Man erkennt, daß bei allen untersuchten Zellinien die Luciferaseaktivität des Adenovirus Ad-mlcLuc geringer ist als die negative Kontrolle mit dem promotorlosen Adenovirus Ad-Luc. Ad-smmhcLuc zeigt in der HeLa-Zellinie eine erhöhte Aktivität und Ad-rsvLuc zeigt als positive Kontrolle in allen untersuchten Zellinien die höchste Luciferaseaktivität.

7. Infektion von primären Zellen in Gewebekultur (in vitro)

Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten von 2 bis 3 Tage alten Tieren wurden wie von Sen, A. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 19132-19136 beschrieben, präpariert und kultiviert. Einen Tag vor der Infektion wurden $2x10^5$ frisch präparierte neonatale Kardiomyozyten in Triplika auf "12 well" Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden in 0,2 ml des jeweiligen serumfreien Mediums, das die rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-RSVLuc, Ad-mlcLuc und Ad-smmhcLuc in einer "multiplicity of infection " (m. o. i.) von 10 enthielt

inkubiert (10 Viren/Zelle). Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schwänken wurden alle 15 Minuten 2 ml des jeweiligen komplettierten Mediums zugegeben. Alle Infektionsexperimente wurden 4mal wiederholt. In analoger Weise wurden primäre neonatale und adulte glatte Muskelzellen der Ratte infiziert.

Die Ergebnisse der Experimente sind schematisch in der Abb. 4 dargestellt. Man erkennt, daß nur in neonatalen Kardiomyocyten die Luciferaseaktivität des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc höher ist als die negative Kontrolle mit dem Adenovirus Ad-Luc, jedoch geringer als die positive Kontrolle mit dem Adenovirus Ad-rsvLuc, aber 300-900mal höher als in glatten Gefäßmuskelzellen. Man erkennt ferner, daß die Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc 129mal höher ist als die von Ad-smmhcLuc. Daraus folgt, daß der mlc-2 Promotor in neonatalen Kardiomyozyten aktiv ist, während die erwartete Aktivität des smmhc-Promotors in neonatalen und adulten glatten Muskelzellen ausblieb.

8. Intracavitäre Injektion rekombinanter Adenoviren in die linke Herzhöhle von neonatalen Ratten

Alle Injektionen wurden an spezifisch pathogenfreien 2-3 Tage alten Spraque Dawley Ratten (CRWiga, Sulzfeld) durchgeführt. Vor den Injektionen wurden die neonatalen Ratten durch 3-5 minütiger Inhalation mit Methoxyfluran (Metofane, Jannssen GmbH) narkotisiert. $2x10^9$ "plaque forming units" (p.f.u.) der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc wurden in einem Volumen von 20 µl mittels einer Tuberkulinspritze (27,5 gauge) injiziert. Die Injektion erfolgte durch direkte Punktion der Herzkammer durch den Brustkorb lateral im 4. Interkostalraum. Durch Aspiration von Herzblut wurde sichergestellt, daß die Nadelspitze intrakavitär positioniert war. Eine langsame Injektion der Viren (20 µl/min) wurde durch einen Aufsatz für Tuberkulinspritzen erreicht. Die Injektion der rekombinanten

Adenoviren in Quadriceps femoris wurde entsprechend durchgeführt.

Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivtät in zwölf verschiedenen Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge , Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) bestimmt. Die ermittelte Luciferaseaktivität in RLU/mg Gewebe wird in Abb. 5 zusammengefaßt. Adenovirus AD-mlcLuc, der den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor trägt, zeigte eine Luciferaseaktivität, die auf den Herzmuskel beschränkt blieb (Abb. 5c). Die Injektion der Positivkontrolle Ad-rsvLuc zeigte die höchste Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, im Herzen und eine starke Luciferaseaktivität in der Lunge, Thymus und Diaphragma (Abb. 5b). Im Ad-Luc injizierten Tier wurde eine geringe Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, Herz, Thymus und Diaphragma gemessen (Abb. 5a). Im Herzen war die Ad-mlcLuc induzierte Luciferaseaktivität 17 mal höher als die von Ad-Luc, während in allen anderen Geweben die Luciferaseaktivität von Ad-Luc und Ad-mlcLuc vergleichbar stark war. Damit wurde gezeigt, daß Ad-mlcLuc spezifisch im Herzen aktiv ist.

Die Verteilung infizierter Herzmuskelzellen nach Injektion von Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten wurde in Vorexperimenten durch die Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-rsvßgal zusätzlich überprüft. Das rekombinante Adenovirus Ad-rsvßgal exprimiert die ß-Galaktosidase als Reportergen unter Kontrolle des "Rous Sarcoma Virus" (rsv) Promotors. Fünf Tage nach der Injektion erfolgte die Sektion des Tieres und die Expression der ß-Galaktosidase wurde nach Färbung des Transgens bestimmt. In den histologischen Schnitten sind infizierte Zellen durch Blaufärbung des Kerns zu erkennen. Etwa die Hälfte der myokardialen ß-Galaktoseaktivität zeigte sich im Bereich der Einstichstelle in die Herzkammer. Entlang des Kanals der Injektionsnadel fand sich in fast allen Kardiomyozyten ß-Galaktosidaseaktivität (Abb. 6a), wohingegen im restlichen

Myokard die Anzahl der infizierten Kardiomyozyten gering war (Abb. 6b).

9. Injektion rekombinanter Adenoviren in die Oberschenkelmuskulatur neonataler Ratten

Um die Aktivität des mlc-2v Promotors im Skelettmuskel zu untersuchen, wurden 20 µl mit $2x10^9$ "plaque forming units" (p.f.u.) der drei rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in den rechten Oberschenkelmuskel Quadriceps femoris neonataler Ratten injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Ad-Luc und Ad-mlcLuc zeigten vergleichbar geringe Luciferaseaktivitäten (RLU/mg Gewebe) im injizierten Muskel, während Ad-rsvLuc sehr stark aktiv war (Tab. 1). Die Luciferaseaktivität, erzielt durch Ad-mlcLuc, betrug 0,05% der Luciferaseaktivität von Ad-rsvLuc. Diese Daten zeigen, daß Ad-mlcLuc im Skelettmuskel nicht aktiv ist und bestätigen die Herzmuskel-spezifische Genexpression durch den rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc.

	Ad-Luc	Ad-rsvLuc	Ad-mlcLuc
$RLUx10^{-3}/mg$	3,4+/-1,2	5670+/-3239	2,8+/-1,8

Tab. 1

10. Nachweis adenoviraler DNA in Geweben nach Injektion rekombinanter Adenoviren in die Herzkammer

Um das Ausmaß der Infektion von Nicht-Herzgewebe nach Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer zu bestimmen, wurde die genomische DNA aus 12 Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps

femoris) isoliert und die Präsenz der adenoviralen DNA in diesen Geweben durch die PCR bestimmt. Es wurden die Gewebe von jeweils zwei mit Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc infizierten Tieren untersucht. In Vorexperimenten wurde die Sensitivität des Nachweises adenoviraler DNA bestimmt, indem 100 ng genomischer DNA von nicht infizierten Ratten mit abnehmenden Mengen adenoviraler DNA Addel324 (von 10 pg bis 0,1 fg) vermischt und anschließend mittels PCR untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, daß 10 fg der adenoviralen DNA Addel324 in 100 ng genomischer DNA nicht infizierter Tiere noch nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht 0,017 adenoviralen Genomen pro Zelle (Abb. 7A). In mit Adenovirus infizierten Tieren wurde die virale DNA regelmäßig im Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma und Leber nachgewiesen (Abb. 4B). Um die Sensitivität des Nachweises der adenoviralen DNA zu steigern, wurden die PCR-Produkte auf eine Nylon-Membran überführt und durch Southern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen. Dies zeigte, daß die adenovirale DNA in geringeren Mengen auch in den anderen Geweben mit geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren nachgewiesen werden kann. In Abb. 4C wird ein repräsentativer Southern-Blot für ein Ad-mlcLuc injiziertes Tier gezeigt.

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß die Genexpression des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc auf den Hermuskel-spezifischen mlc-2v Promotor und nicht auf eine lokal erhöhte Viruskonzentration zurückzuführen ist.

11. Vergleich der spezifischen Aktivität des mlc-Promotors mit dem αmhc-Promotor

Nach intrakavitärer Injektion von ca. $2x10^9$ "plaque forming units" der rekombinanten Adenoviren Ad-αmhcLuc (Abb. 8A) und Ad-mlcLuc (Abb. 8B) in die linke Hauptkammer neonataler Ratten konnte für beide Adenoviren die höchste Luciferaseaktivität im Herzen nachgewiesen werden. Jedoch ist der rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc 3-4 mal aktiver im

Herzen als Ad-mhcLuc. Zudem ist der rekombinante Adenovirus Ad-mhcLuc in der Niere, der Milz, der Leber, der Diaphragma, der Lunge und dem Intercostalmuskel aktiver als Ad-mlcLuc. Daraus folgt, daß der mlc-2 Promotor im adenoviralen Vektorsystem die Expression der Luciferase wesentlich stärker auf das Herz beschränkt als der α_{mhc}-Promotor und zusätzlich ist der mlc-2 Promotor im Herzen 3-4mal aktiver als der α_{mhc}-Promotor.

12. Nachweis der Ventrikel-spezifischen Expression

$2x10^9$ "plaque forming units" der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, Ad-mhcLuc und Ad-Luc wurden in einem Volumen von 20-40 µl in den linken Ventrikel neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. In vier unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, daß nur für den rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc eine auf den Ventrikel beschränkte Genexpression gemessen werden kann (Abb. 9). Das Verhältnis der Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc im Ventrikel zum Atrium betrug ca. 30, während es für alle anderen Viren das 1-2fache betrug (Abb. 9C).

Patentansprüche

1. Gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert.

2. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz vom Herzen eines Säugetiers, insbesondere vom Menschen oder von einem Nager, vor allem von einer Ratte abstammen.

3. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz die Nukleinsäuren von den Positionen von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -800, vor allem von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1600 und insbesondere von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1800, vor allem von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2100 oder von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2700 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens umfassen.

4. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz das HF-1a Element, das HF-1b Element, das MLE1 Element und das HF-3 Element umfassen.

5. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz zusätzlich das E-Box Element und/oder das HF-2 Element umfassen.

6. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz zusätzlich die CSS Sequenz umfaßt.

7. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz eine DNA- oder RNA-Sequenz, vorzugsweise eine DNA-Sequenz ist.

8. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA- oder RNA-Sequenz in einem Virusvektor enthalten ist.

9. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA-Sequenz in einem Adenovirusvektor oder Adeno-assoziierten Virusvektor, vorzugsweise in einem Adenovirusvektor enthalten ist.

10. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Adenovirusvektor ein replikationsdefizienter Adenovirusvektor ist.

11. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Adeno-assoziierte Virusvektor ausschließlich aus zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

12. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß das therapeutische Genprodukt ausgewählt ist aus Dystrophin, ß-adrenergischer Rezeptor oder Stickstoffmonoxid-Synthase.

13. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt kodiert, eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine polyA Sequenz enthält.

14. Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäurekonstruktes gemäß einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden wird, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Nukleinsäuresequenz zusätzlich in einen Virusvektor gemäß einem der Ansprüche 8-11 kloniert wird und/oder mit Liposomen komplexiert wird.

16. Verwendung eines Nukleinsäurekontruktes gemäß einem der Ansprüche 1-13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur gentherapeutischen Behandlung einer Herzerkrankung.

17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Herzerkrankung um die Herzinsuffizienz, dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie, Dystrophinopathie, Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose und/oder Restenose der Blutgefäße handelt.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Arzneimittel im wesentlichen in der Herzkammer wirkt.

19. Arzneimittel enthaltend ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 1-13 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

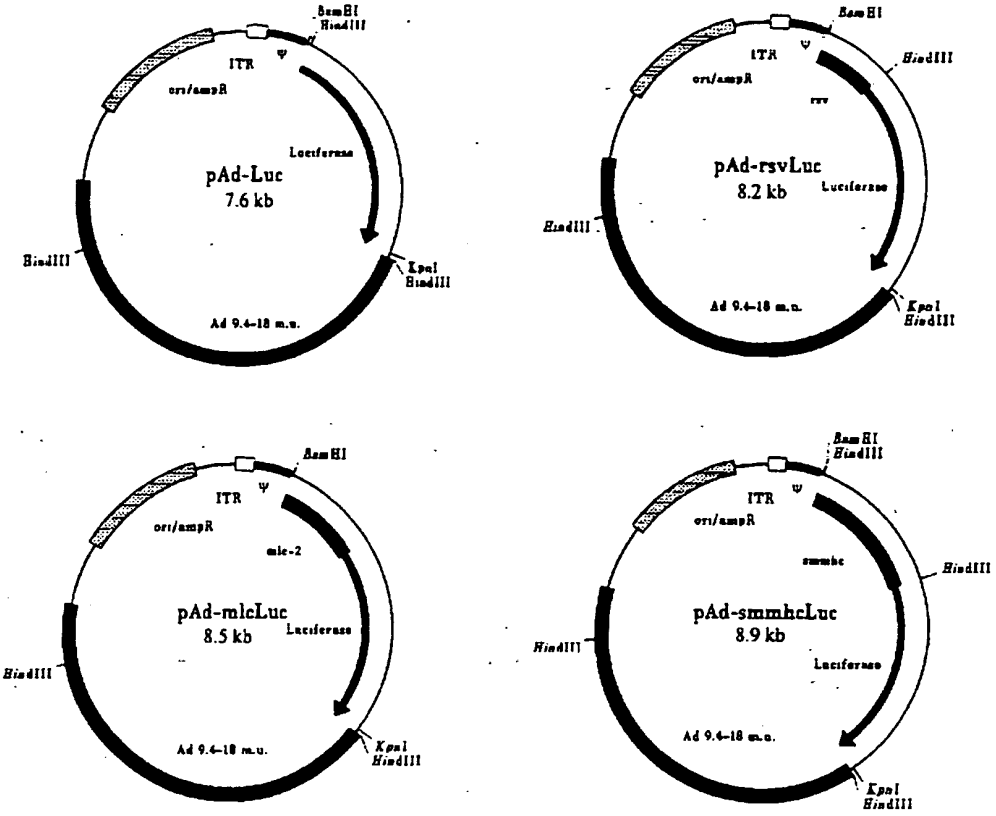

BamHI
HindIII
ITR
Ψ
ori/ampR
Luciferase
pAd-Luc
7.6 kb
HindIII
KpnI
HindIII
Ad 9.4-18 m.u.
BamHI
ITR
Ψ
ori/ampR
rsv
HindIII
pAd-rsvLuc
8.2 kb
Luciferase
HindIII
Ad 9.4-18 m.u.
KpnI
HindIII
BamHI
ITR
Ψ
ori/ampR
mlc-2
pAd-mlcLuc
8.5 kb
Luciferase
HindIII
Ad 9.4-18 m.u.
KpnI
HindIII
BamHI
HindIII
ITR
Ψ
ori/ampR
smmhc
HindIII
pAd-smmhcLuc
8.9 kb
Luciferase
HindIII
Ad 9.4-18 m.u.
KpnI
HindIII

Abb. 1

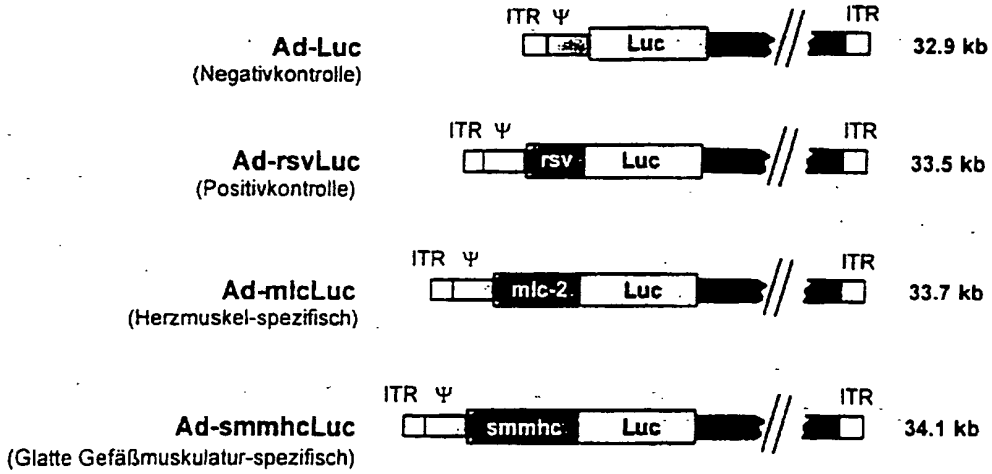
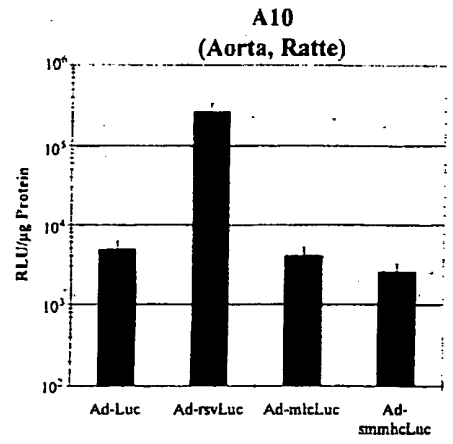
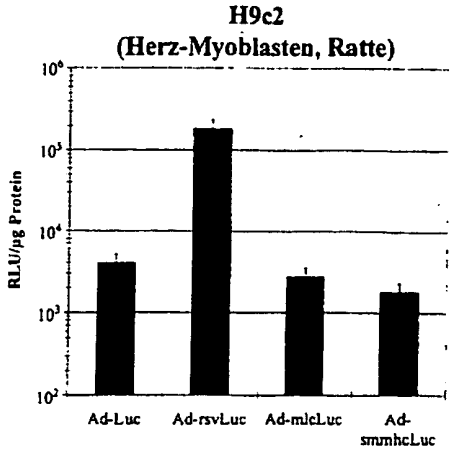

Ad-Luc
(Negativkontrolle)
ITR Ψ
Luc
ITR
32.9 kb
Ad-rsvLuc
(Positivkontrolle)
ITR Ψ
rsv
Luc
ITR
33.5 kb
Ad-mlcLuc
(Herzmuskel-spezifisch)
ITR Ψ
mlc-2
Luc
ITR
33.7 kb
Ad-smmhcLuc
(Glatte Gefäßmuskulatur-spezifisch)
ITR Ψ
smmhc
Luc
ITR
34.1 kb

Abb. 2


A10
(Aorta, Ratte)
RLU/µg Protein
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Ad-Luc
Ad-rsvLuc
Ad-mlcLuc
Ad-smmhcLuc


H9c2
(Herz-Myoblasten, Ratte)
RLU/µg Protein
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Ad-Luc
Ad-rsvLuc
Ad-mlcLuc
Ad-smmhcLuc

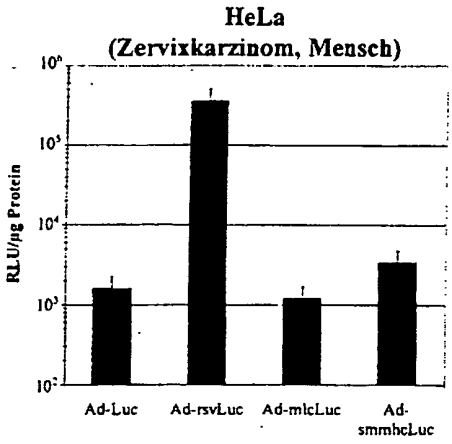
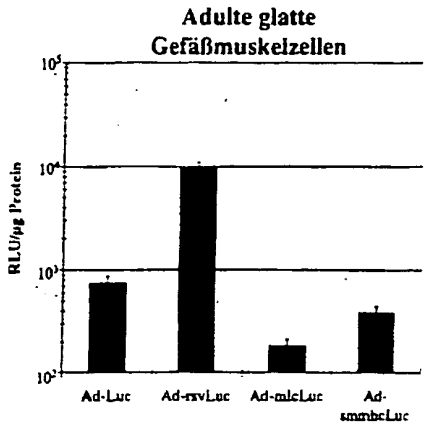
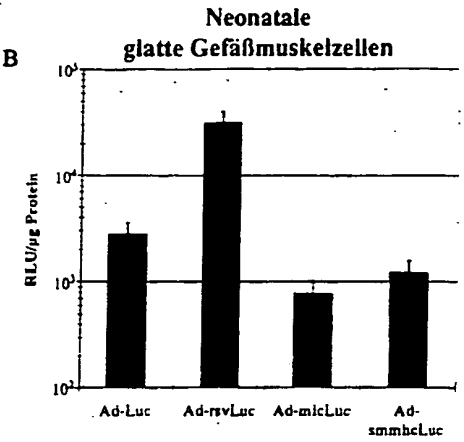

HeLa
(Zervixkarzinom, Mensch)
RLU/µg Protein
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Ad-Luc
Ad-rsvLuc
Ad-mlcLuc
Ad-smmhcLuc

Abb. 3

A


Adulte glatte
Gefäßmuskelzellen
RLU/µg Protein
Ad-Luc
Ad-rsvLuc
Ad-mlcLuc
Ad-smmhcLuc

B


Neonatale
glatte Gefäßmuskelzellen
RLU/µg Protein
Ad-Luc
Ad-rsvLuc
Ad-mlcLuc
Ad-smmhcLuc

C

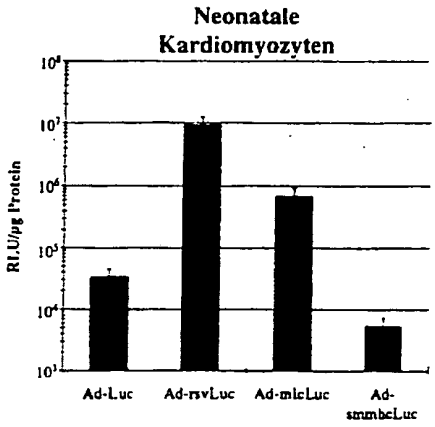
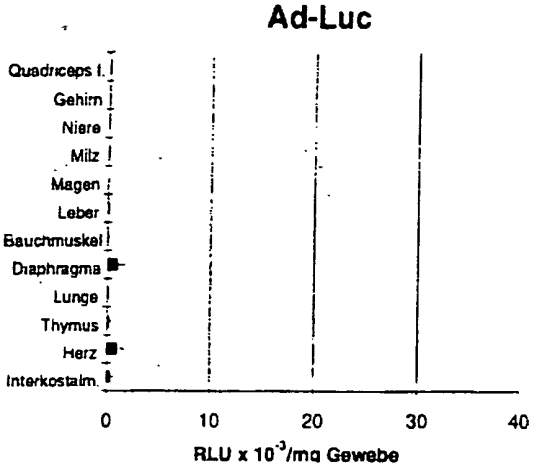
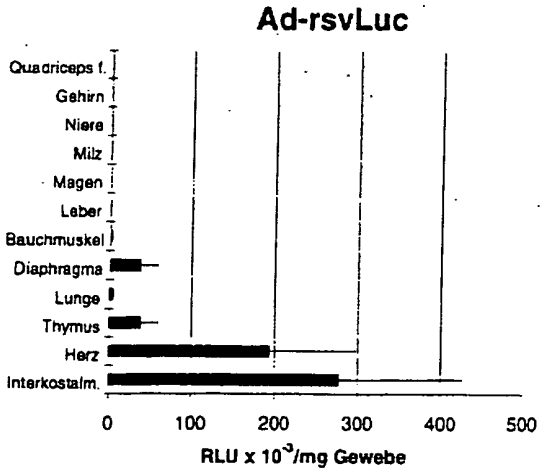

Neonatale
Kardiomyozyten
RLU/µg Protein
Ad-Luc
Ad-rsvLuc
Ad-mlcLuc
Ad-smmhcLuc

Abb. 4

A


Ad-Luc
Quadriceps f.
Gehirn
Niere
Milz
Magen
Leber
Bauchmuskel
Diaphragma
Lunge
Thymus
Herz
Interkostalm.
0
10
20
30
40
RLU x 10-3/mg Gewebe

B


Ad-rsvLuc
Quadriceps f.
Gehirn
Niere
Milz
Magen
Leber
Bauchmuskel
Diaphragma
Lunge
Thymus
Herz
Interkostalm.
0
100
200
300
400
500
RLU x 10-3/mg Gewebe

C

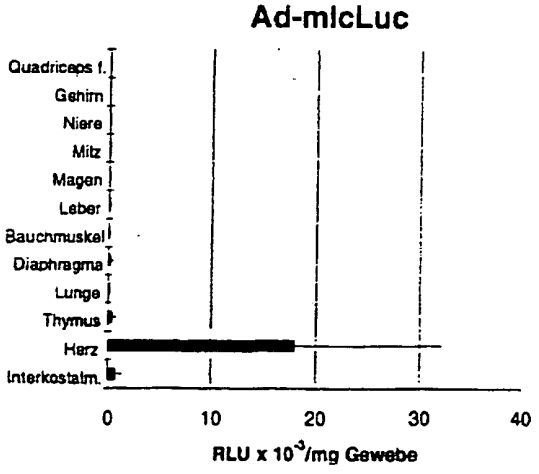

Ad-mlcLuc
Quadriceps f.
Gehirn
Niere
Milz
Magen
Leber
Bauchmuskel
Diaphragma
Lunge
Thymus
Herz
Interkostalm.
0
10
20
30
40
RLU x 10-3/mg Gewebe

Abb. 5





Abb. 6

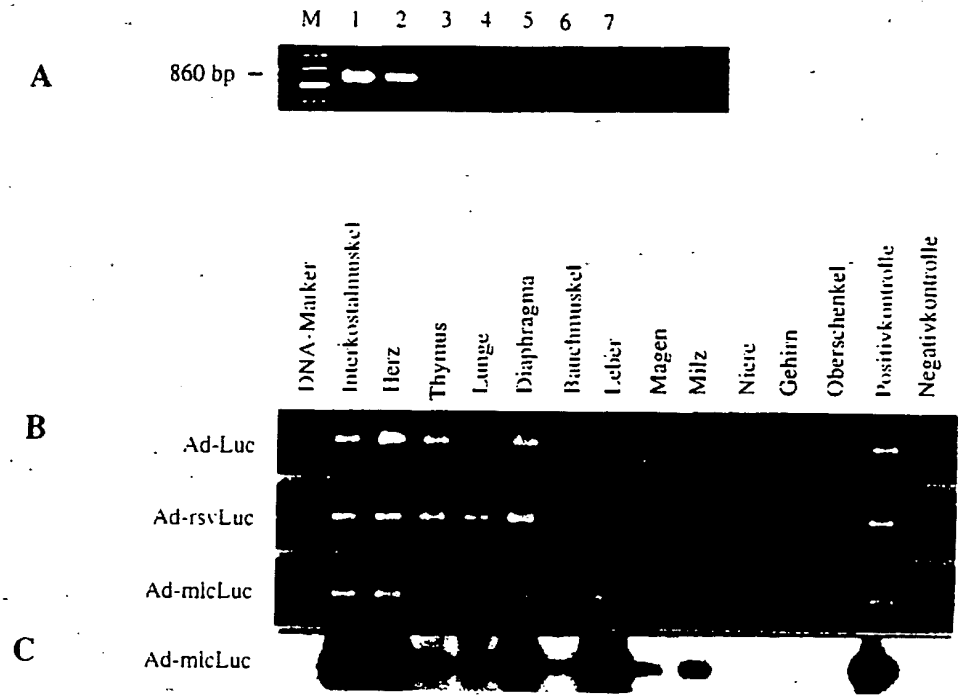
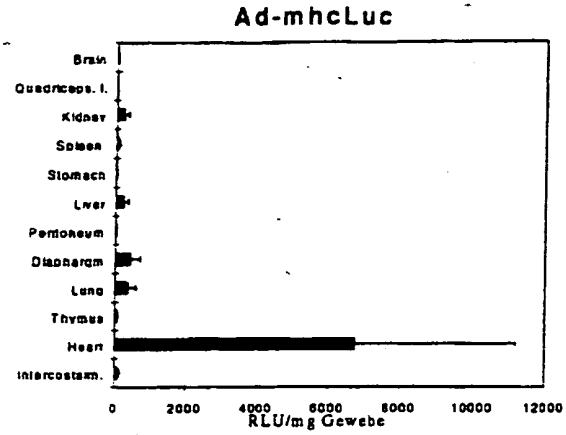

M 1 2 3 4 5 6 7
A
860 bp
DNA-Marker
Interkostalmuskel
Herz
Thymus
Lunge
Diaphragma
Bauchmuskel
Leber
Magen
Milz
Niere
Gehirn
Oberschenkel
Positivkontrolle
Negativkontrolle
B
Ad-Luc
Ad-rsvLuc
Ad-mlcLuc
C
Ad-mlcLuc

Abb. 7

A


Ad-mhcLuc
Brain
Quadriceps. f.
Kidney
Spleen
Stomach
Liver
Peritoneum
Diaphragm
Lung
Thymus
Heart
Intercostalm.
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
RLU/mg Gewebe

B

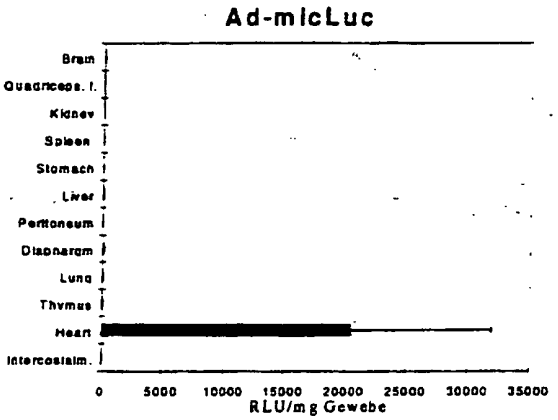
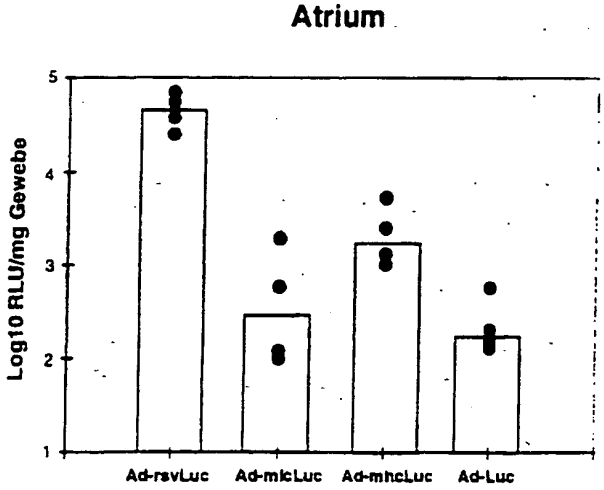
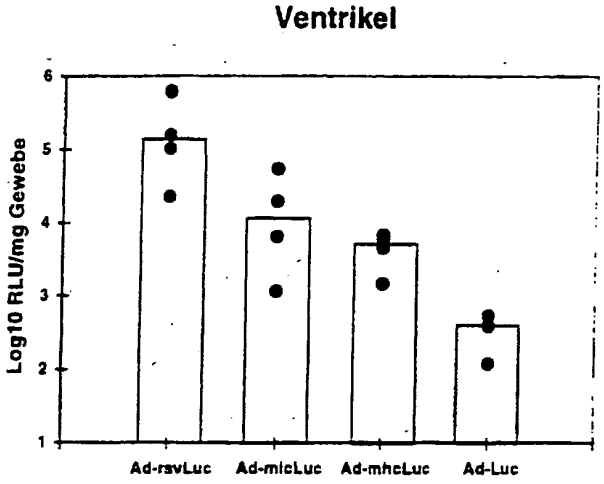

Ad-mlcLuc
Brain
Quadriceps. f.
Kidney
Spleen
Stomach
Liver
Peritoneum
Diaphragm
Lung
Thymus
Heart
Intercostalm.
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
RLU/mg Gewebe

Abb. 8

A


Atrium
Log10 RLU/mg Gewebe
5
4
3
2
1
Ad-rsvLuc
Ad-micLuc
Ad-mhcLuc
Ad-Luc

B


Ventrikel
Log10 RLU/mg Gewebe
6
5
4
3
2
1
Ad-rsvLuc
Ad-micLuc
Ad-mhcLuc
Ad-Luc

C

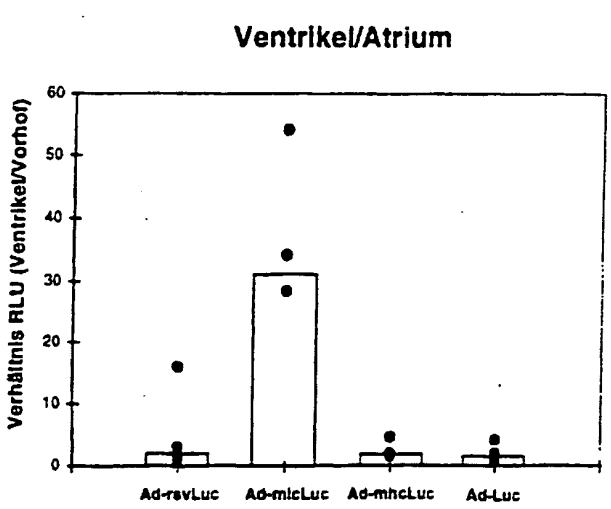

Ventrikel/Atrium
Verhältnis RLU (Ventrikel/Vorhof)
60
50
40
30
20
10
0
Ad-rsvLuc
Ad-micLuc
Ad-mhcLuc
Ad-Luc

Abb. 9

```
GAAGTGAAAT CTGAATAATT TTGTGTTACT CATAGCGCGT AATATTTGTC        50

TAGGGCCGCG GGACTTTGAC CGTTTACGTG GAGACTCGCC CAGGTGTTTT       100

                                                  ... Verpackungsse-
TCTCAGGTGT TTTCCGCGTT CCGGGTCAAA GTTGGCGTTT TATTATTATA       150

quenz¦  BamHI                                        KpnI
GTCAGGGGGA TCCGGAATTC TTGAAGACGA AAGGGCCCGG TACCCAGGAC       200

TGATTCTCGG AAAGTTCTAG GCTGCAGAAA TCTCACACGC ACAAGAGTTT       250

GGAGTCACAG GATGGGTGTC CGCCAAGAGC CTAGGGACAG AACGTTGTCA       300

GCCCCTGTGC CCGGACCCTG TGGACTGTGA GAAGAGCAGA GTCCCACCCC       350

CAGGCCTTCT TAGACCCACC CCGGGTTTTC CCAGCATCCT TCCTGCAGGA       400

CCGGACCCCT GGCTGAAAGT ACAGAAACCC TAGAGTCTGC AGCCCATGTG       450

GCTGGGCCGC CATGTTTCCA GAATCCTCTG GTCTAAGGAT CCAGACCTCT       500

TACGGAGCCC AACAGCTCAA GGGACAGTTA GCATGTTCAT GTGTACTGGG       550

AGGAGCAGGA GCCAACAGAG GTCATGAAGA TCCACAGGGG CTCCGGTTCC       600

GAGGCCCTTG GGTTTTATCA CCAAATGTTT CCCACCCAGC AACATAAAAC       650

                                                  CSS-ähnliche
AGCTCCTCAG ACAGCGCAGT GGACCAGTGG ACCACAGGGA CAGATCACCT       700

     Sequenz
CTGTGGGCCC AGACTCATAG TAACCTCTAA CCTCAATCTC CAGCCTCCCA       750

CAGTCATTGT CGGTCACCTT GTTTCTCAGC CACCACACTT GGCAAGTCAC       800

GTGTGCCTCA ACACAATCTT CAGAAGCCAG GGGGATGGGG TTTTGTTTAA       850

CTGATGGGTG TTTTGTTTTG TTTTGTTTCA TTAACTGTCA CGTAGCCCAG       900

GCTAGCCTTG AACTCACTAT GTAGGCAAGC ATGACCATGA ACTTCTGATC       950
```

Abb. 10A

CTCCTTCCTC AGTGTCCTGG GATAACAGGT GTGTGTCACT CCCTACCCTT 1000

CTAATAGCAA TATGTGGCCA CATGTTTGTG CCCCACAGGT TGAGACCATC 1050

TTGACCTGAG GAAGAAATAG CTAACACTCA CCTCCTGAAG GTTGCCTGGA 1100

TCTCGTCTTT GTCTTTCCAG CACTCAGGAG TGGGGGGGTC AGAAGTGCAA 1150

AGTCAGCCCC TGCTACATAA TGAGTTCAAG GCTCGCCTGG GCTACATGAG 1200

ACCATGCCTC AAAAAGAAAA GGAATTGGTA TAGTGACATA CTCTGGTCCT 1250

CCCAGTACTT AGGGACACAG AGGCCACTCC ACCACCATCT CCAGCAGCTG 1300

GCCTGCCTCC CCGAGCCTCG TTTATTTCAT ATCAATGAGA TGGGGACCCA 1350

ACTGCTAAGG TGACCTTGCA CCCACGGGGT GACTGGAGAC TTGAGAGTGG 1400

AGGGTTTATC ATTTCTCCAG TCGGTCAGCA AGTGGTCGCC GCCAAGAAGG 1450

TTTTGAGTTC AAAGTAGAAG ATGGGACAGG GAGAGACCAG CGAGAAGACC 1500

CCACCCTGGA GCTGACTGTC CCTGTGCGGC TGGGTGGGGA CACAAAGCAG 1550

AGAAGCAGAG GCAGAGAACA AGGGTGGGTG ACATTTGAGC AAGGATGGGG 1600

GTGTGCCAGA GGCTGCCCAA GATGCATAGG TGCAAAGGCC CTGAGGTTCG 1650

AGGATGCCTG GATCCGGAAT CAAAGCTCAG GCTCCTCCCT CTTCCTCCTC 1700

CTCCTCTGCC CCCTCCTCCT CCTCTGCCCC CTCTTCCTCC TCTGCCCCCT 1750

CTTCTTCCTC CTCCTCTTCC TCCTCCCCTC CTCATCTACC TCCTTCTCCT 1800

CCTCCTCCCC CTCCTCTTCC TCCTCTGCCC CCTCTTCCTC CTCCTCCTCT 1850

TCCTCCTCCT CTTCCTCCTC CCCTCCTCAT CTACCTCCTT CTCCTCCTCC 1900

Abb. 10B

TCCCCCTCCT CTTCCTCCTC TGCCCCCTCT TCCTCCTCTG CCCCTCTTCC 1950

TCCTCCTCCT CTTCCTCCTC TGCCCCCTCC TCCCCCTCCT CTTCCTCTTC 2000

CTCCTCCCCT CCTCATCTAC CTCCTTCTCT TCCTCCTCTT CTTCCTCCTC 2050

TTTCTCCTCC TCCTCCCTCT CCTCTTCCTC CTCCTCTTCT TTCTCCTCCT 2100

CCTCTTCCTC CCCCTCCCCT TCCTGGGTTA CTTTTCCCCA TTAGACAATG 2150

GCAGGACCCA GAGCACAGAG CATCGTTCCC AGGCCAGGCC CCAGCCACTG 2200

HF-3 Element MLE1 Element
TCTCTTTAAC CTTGAAGGCA TTTTTGGGTC TCACGTGTCC ACCCAGGCGG 2250

HF-2 Element
GTGTCGGACT TTGAACGGCT CTTACTTCAG AAGAACGGCA TGGGGTGGGG 2300

E-Box HF-1a ¦HF-
GGGCTTAGGT GGCCTCTGCC TCACCTACAA CTGCCAAAAG TGGTCATGGG 2350

1b Element
GTTATTTTTA ACCCCAGGGA AGAGGTATTT ATTGTTCCAC AGCAGGGGCC 2400

+1
GGCCAGCAGG CTCCTTGAAT TCGACCCCTT CGAGCTTGGC ATTCCGGTAC 2450

¦ Luciferase-kodierende Sequenz ...
TGTTGGTAAA ATGGAAGACG CCAAAAACAT AAAGAAAGGC CCGGCGCCAT 2500

TCTATCCTCT AGAGGATGGA ACCGCTGGAG AGCAACTGCA TAAGGCTATG 2550

AAGAGATACG CCCTGGTTCC TGGAACAATT GCTTTTACAG ATGCACATAT 2600

CGAGGTGAAC ATCACGTTCG CGGAATACTT CGAAATGTCC GTTTCGGTTG 2650

GCAGAAGCTA TGAAACGATA TGGGCTGAAT ACAAATCACA GAATCGTCGT 2700

ATGCAGTGAA AACTCTCTTT CAATTCTTTA TGCCGGTGTT GGGCCCGTTA 2750

TTTATCCGGA GTTGCAGTTG CCGCCCGCCG AACA

Abb. 10C

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/86, A61K 31/70, 48/00 //
C12N 9/02, C07K 14/47, 14/705

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/17937**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Mai 1997 (22.05.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02181

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. November 1996 (14.11.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 42 838.2 17. November 1995 (17.11.95) DE
196 40 630.7 1. Oktober 1996 (01.10.96) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: FRANZ, Wolfgang-M. [DE/DE]; Fasanenring 15b, D-23627 Gross Grönau (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: ROTHMANN, Thomas [DE/DE]; Im Karolingerweg 11, D-69123 Heidelberg (DE). KATUS, H.A. [DE/DE]; Domhof 23, D-23909 Ratzeburg (DE).

(74) Anwalt: BARDEHLE, PAGENBERG, DOST, ALTENBURG, FROHWITTER, GEISLER & PARTNER; Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).

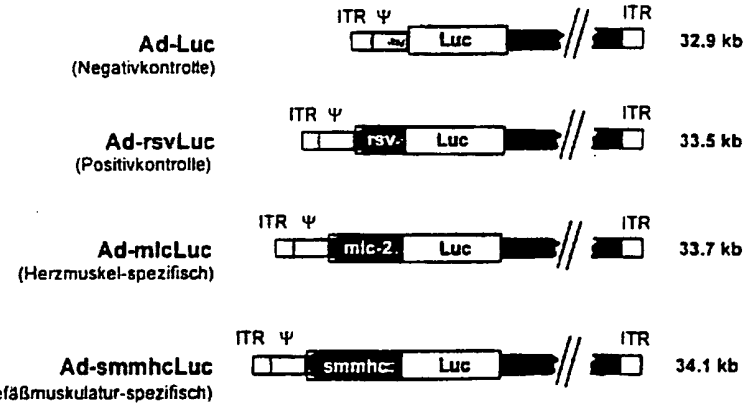
(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. Juli 1997 (17.07.97)

(54) Title: GENE-THERAPEUTIC NUCLEIC ACID CONSTRUCT, PRODUCTION OF SAME AND USE OF SAME IN THE TREATMENT OF HEART DISORDERS

(54) Bezeichnung: GENTHERAPEUTISCHES NUKLEINSÄUREKONSTRUKT, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG VON HERZERKRANKUNGEN



(57) Abstract

The invention relates to a gene-therapeutic nucleic acid construct containing a regulatory nucleic acid sequence of the 5'-end of the myosin light chain 2 (MLC-2) heart gene. The regulatory nucleic acid sequence in question is functionally connected to a nucleic acid which codes for a therapeutically active gene product, antisense nucleic acid or ribozyme. Also disclosed is a process for producing the construct and its use in gene therapy for treating heart disorders.

(57) Zusammenfassung

Bei der Erfindung handelt es sich um ein gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert, sowie um ein Verfahren zu dessen Herstellung und die Verwendung zur gentherapeutischen Behandlung von Herzerkrankungen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien
AT	Österreich
AU	Australien
BB	Barbados
BE	Belgien
BF	Burkina Faso
BG	Bulgarien
BJ	Benin
BR	Brasilien
BY	Belarus
CA	Kanada
CF	Zentrale Afrikanische Republik
CG	Kongo
CH	Schweiz
CI	Côte d'Ivoire
CM	Kamerun
CN	China
CS	Tschechoslowakei
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DK	Dänemark
EE	Estland
ES	Spanien
FI	Finnland
FR	Frankreich
GA	Gabon
GB	Vereinigtes Königreich
GE	Georgien
GN	Guinea
GR	Griechenland
HU	Ungarn
IE	Irland
IT	Italien
JP	Japan
KE	Kenya
KG	Kirgisistan
KP	Demokratische Volksrepublik Korea
KR	Republik Korea
KZ	Kasachstan
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LR	Liberia
LK	Litauen
LU	Luxemburg
LV	Lettland
MC	Monaco
MD	Republik Moldau
MG	Madagaskar
ML	Mali
MN	Mongolei
MR	Mauretanien
MW	Malawi
MX	Mexiko
NE	Niger
NL	Niederlande
NO	Norwegen
NZ	Neuseeland
PL	Polen
PT	Portugal
RO	Rumänien
RU	Russische Föderation
SD	Sudan
SE	Schweden
SG	Singapur
SI	Slowenien
SK	Slowakei
SN	Senegal
SZ	Swasiland
TD	Tschad
TG	Togo
TJ	Tadschikistan
TT	Trinidad und Tobago
UA	Ukraine
UG	Uganda
US	Vereinigte Staaten von Amerika
UZ	Usbekistan
VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/02181

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 A61K31/70 A61K48/00 //C12N9/02,C07K14/47, C07K14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 39, 1 September 1995, pages 23173-23178, XP002001049 HUNTER J J ET AL: "VENTRICULAR EXPRESSION OF A MLC-2V-RAS FUSION GENE INDUCES CARDIAC HYPERTROPHY AND SELECTIVE DIASTOLIC DYSFUNCTION IN TRANSGENIC MICE"	1,2
Y	see the whole document ---	3-19
Y	CARDIOSCIENCE, vol. 5, no. 4, December 1994, LONDON, UK, pages 235-243, XP000673425 W.-M. FRANZ ET AL.: "Characterization of a cardiac-selective and developmentally upregulated promoter in transgenic mice" cited in the application see the whole document ---	1-19

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 May 1997	20. 05. 97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Hornig, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 44 41 327 C (INST PFLANZENGENETIK UND KULTU) 9 November 1995 see the whole document	1-19
Y	WO 94 11506 A (ARCH DEV CORP) 26 May 1994 cited in the application see the whole document	1-19
A	J. MOL. CELL CARDIOL., vol. 27, no. 10, October 1995, ACADEMIC PRESS LIMITED, NY, US, pages 2359-2372, XP000673465 S.K. DOUD ET AL.: "Adaptional response in transcription factors during development of myocardial hypertrophy" see the whole document	1-19
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 22, 1 January 1992, pages 15875-15885, XP002001050 LEE K J ET AL: "MYOSIN LIGHT CHAIN-2 LUCIFERASE TRANSGENIC MICE REVEAL DISTINCT REGULATORY PROGRAMS FOR CARDIAC AND SKELETAL MUSCLE-SPECIFIC EXPRESSION OF A SINGLE CONTRACTILE PROTEIN GENE" see the whole document	1-19
A	J. BIOL. CHEM., vol. 264, no. 30, 25 October 1989, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US, pages 18142-18148, XP002030651 S.A. HENDERSON ET AL.: "Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene" cited in the application see the whole document	1-19
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 14, no. 2, February 1994, ASM WASHINGTON, DC,US, pages 1220-1229, XP000673426 K.J. LEE ET AL.: "Positive regulatory elements (HF-1a and HF-1b) and a novel negative regulatory element (HF-3) mediate ventricular muscle-specific expression of myosin light-chain 2-luciferase fusion genes in transgenic mice" cited in the application see the whole document	1-19

-/--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CIRCULATION, vol. 92, no. 8, SUPPL. 01, 15 October 1995, page I114 XP002001047 WOBUS A M ET AL: "RETINOIC ACID INDUCES EXPRESSION OF THE VENTRICULAR 2.1 KB MYOSIN-LIGHT-CHAIN-2 PROMOTER DURING IN VITRO CARDIOGENESIS OF EMBRYONIC STEM CELLS" abstract no. 0536 see the whole document	1-19
A	WO 95 00655 A (MC MASTER UNIVERSITY) 5 January 1995 cited in the application see the whole document	1-19
A	WO 95 02697 A (RHONE POULENC RORER SA ;PERRICAUDET MICHEL (FR); VIGNE EMMANUELLE) 26 January 1995 see the whole document	1-19
A	WO 95 23867 A (RHONE POULENC RORER SA ;DENEFLE PATRICE (FR); LATTA MARTINE (FR);) 8 September 1995 cited in the application see the whole document	1-19
P,X	THIRD MEETING OF THE EUROPEAN WORKING GROUP OF HUMAN GENE TRANSFER AND THERAPY, BARCELONA, SPAIN, NOVEMBER 17-20, 1995. GENE THERAPY 2 (SUPPL. 1). 1995. S18. ISSN: 0969-7128, XP002030652 ROTHMANN T ET AL: "Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus." abstract no. 66 see abstract	1-19
P,X	GENE THERAPY, vol. 3, no. 10, October 1996, MACMILLAN PRESS, UK, pages 919-926, XP000673471 T. ROTHMANN ET AL.: "Heart muscle specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus" see the whole document	1-19

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

.ormation on patent family members

Intern· ·al Application No
PCT/DE 96/02181

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4441327 C	09-11-95	WO 9616163 A	30-05-96
WO 9411506 A	26-05-94	AU 5609394 A	08-06-94
		CA 2149771 A	26-05-94
		EP 0668913 A	30-08-95
		JP 8506008 T	02-07-96
WO 9500655 A	05-01-95	AU 7118494 A	17-01-95
		CA 2166118 A	05-01-95
		EP 0705344 A	10-04-96
WO 9502697 A	26-01-95	FR 2707664 A	20-01-95
		FR 2718749 A	20-10-95
		AU 7264694 A	13-02-95
		CA 2144040 A	26-01-95
		CN 1113390 A	13-12-95
		CZ 9500639 A	15-11-95
		EP 0667912 A	23-08-95
		FI 951138 A	13-04-95
		HU 72558 A	28-05-96
		JP 8501703 T	27-02-96
		NO 950939 A	10-03-95
		NZ 269156 A	26-03-96
		PL 308122 A	24-07-95
		SK 31295 A	08-05-96
		ZA 9405012 A	20-02-95
WO 9523867 A	08-09-95	FR 2716893 A	08-09-95
		AU 1852695 A	18-09-95
		CA 2184113 A	08-09-95
		EP 0748385 A	18-12-96
		ZA 9501803 A	09-01-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/DE 96/02181

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/86 A61K31/70 A61K48/00 //C12N9/02,C07K14/47, C07K14/705

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 270, Nr. 39, 1.September 1995, Seiten 23173-23178, XP002001049 HUNTER J J ET AL: "VENTRICULAR EXPRESSION OF A MLC-2V-RAS FUSION GENE INDUCES CARDIAC HYPERTROPHY AND SELECTIVE DIASTOLIC DYSFUNCTION IN TRANSGENIC MICE"	1,2
Y	siehe das ganze Dokument ---	3-19
Y	CARDIOSCIENCE, Bd. 5, Nr. 4, Dezember 1994, LONDON, UK, Seiten 235-243, XP000673425 W.-M. FRANZ ET AL.: "Characterization of a cardiac-selective and developmentally upregulated promoter in transgenic mice" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	1-19

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
9.Mai 1997	20. 05. 97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Hornig, H

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 44 41 327 C (INST PFLANZENGENETIK UND KULTU) 9.November 1995 siehe das ganze Dokument	1-19
Y	WO 94 11506 A (ARCH DEV CORP) 26.Mai 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-19
A	J. MOL. CELL CARDIOL., Bd. 27, Nr. 10, Oktober 1995, ACADEMIC PRESS LIMITED, NY, US, Seiten 2359-2372, XP000673465 S.K. DOUD ET AL.: "Adaptional response in transcription factors during development of myocardial hypertrophy" siehe das ganze Dokument	1-19
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 267, Nr. 22, 1.Januar 1992, Seiten 15875-15885, XP002001050 LEE K J ET AL: "MYOSIN LIGHT CHAIN-2 LUCIFERASE TRANSGENIC MICE REVEAL DISTINCT REGULATORY PROGRAMS FOR CARDIAC AND SKELETAL MUSCLE-SPECIFIC EXPRESSION OF A SINGLE CONTRACTILE PROTEIN GENE" siehe das ganze Dokument	1-19
A	J. BIOL. CHEM., Bd. 264, Nr. 30, 25.Oktober 1989, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US, Seiten 18142-18148, XP002030651 S.A. HENDERSON ET AL.: "Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-19
A	MOL. CELL. BIOL., Bd. 14, Nr. 2, Februar 1994, ASM WASHINGTON, DC,US, Seiten 1220-1229, XP000673426 K.J. LEE ET AL.: "Positive regulatory elements (HF-1a and HF-1b) and a novel negative regulatory element (HF-3) mediate ventricular muscle-specific expression of myosin light-chain 2-luciferase fusion genes in transgenic mice" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-19

1 -/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CIRCULATION, Bd. 92, Nr. 8, SUPPL. 01, 15.Oktober 1995, Seite I114 XP002001047 WOBUS A M ET AL: "RETINOIC ACID INDUCES EXPRESSION OF THE VENTRICULAR 2.1 KB MYOSIN-LIGHT-CHAIN-2 PROMOTER DURING IN VITRO CARDIOGENESIS OF EMBRYONIC STEM CELLS" abstract no. 0536 siehe das ganze Dokument	1-19
A	WO 95 00655 A (MC MASTER UNIVERSITY) 5.Januar 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-19
A	WO 95 02697 A (RHONE POULENC RORER SA ;PERRICAUDET MICHEL (FR); VIGNE EMMANUELLE) 26.Januar 1995 siehe das ganze Dokument	1-19
A	WO 95 23867 A (RHONE POULENC RORER SA ;DENEFLE PATRICE (FR); LATTA MARTINE (FR);) 8.September 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-19
P,X	THIRD MEETING OF THE EUROPEAN WORKING GROUP OF HUMAN GENE TRANSFER AND THERAPY, BARCELONA, SPAIN, NOVEMBER 17-20, 1995. GENE THERAPY 2 (SUPPL. 1). 1995. S18. ISSN: 0969-7128, XP002030652 ROTHMANN T ET AL: "Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus." abstract no. 66 siehe Zusammenfassung	1-19
P,X	GENE THERAPY, Bd. 3, Nr. 10, Oktober 1996, MACMILLAN PRESS, UK, Seiten 919-926, XP000673471 T. ROTHMANN ET AL.: "Heart muscle specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus" siehe das ganze Dokument	1-19

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 96/02181

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4441327 C	09-11-95	WO 9616163 A	30-05-96
WO 9411506 A	26-05-94	AU 5609394 A	08-06-94
		CA 2149771 A	26-05-94
		EP 0668913 A	30-08-95
		JP 8506008 T	02-07-96
WO 9500655 A	05-01-95	AU 7118494 A	17-01-95
		CA 2166118 A	05-01-95
		EP 0705344 A	10-04-96
WO 9502697 A	26-01-95	FR 2707664 A	20-01-95
		FR 2718749 A	20-10-95
		AU 7264694 A	13-02-95
		CA 2144040 A	26-01-95
		CN 1113390 A	13-12-95
		CZ 9500639 A	15-11-95
		EP 0667912 A	23-08-95
		FI 951138 A	13-04-95
		HU 72558 A	28-05-96
		JP 8501703 T	27-02-96
		NO 950939 A	10-03-95
		NZ 269156 A	26-03-96
		PL 308122 A	24-07-95
		SK 31295 A	08-05-96
		ZA 9405012 A	20-02-95
WO 9523867 A	08-09-95	FR 2716893 A	08-09-95
		AU 1852695 A	18-09-95
		CA 2184113 A	08-09-95
		EP 0748385 A	18-12-96
		ZA 9501803 A	09-01-96